



TITLE:

膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究 第11報:
specificADCCactivityについて

AUTHOR(S):

西尾, 正一; 浅川, 正純; 田中, 重人; 和田, 誠次; 前川,
正信; 川村, 正喜

CITATION:

西尾, 正一 ...[et al]. 膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究 第11報:
specificADCCactivityについて. 泌尿器科紀要 1986, 32(5): 713-720

ISSUE DATE:

1986-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/118818>

RIGHT:

膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究

第11報：specific ADCC activity について

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室（主任：前川正信教授）

西	尾	正	一
浅	川	正	純
田	中	重	人
和	田	誠	次
前	川	正	信

大阪市立城北市民病院泌尿器科（部長 川村正喜）

川 村 正 喜

STUDIES ON THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN
PATIENTS WITH URINARY BLADDER CARCINOMA

XI: EVALUATION OF SPECIFIC ADCC ACTIVITY

Shoichi NISHIO, Masazumi ASAKAWA, Shigeto TANAKA,

Seiji WADA and Masanobu MAEKAWA

*From the Department of Urology, Osaka University Medical School**(Director: Prof. M. Maekawa)*

Masaki KAWAMURA

*From the Department of Urology, Shirokita Municipal Hospital**(Chief: Dr. M. Kawamura)*

We previously reported that the activity of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of lymphocytes from the patients with urinary bladder carcinoma was lower than that of normal subjects.

We performed the specific ADCC assay using SRBC as the target cells, coated with tumor extract from the urinary bladder carcinoma. At the same time, the antiserum was collected from the immunized rabbit by the same tumor extract.

The addition of the antiserum from the immunized rabbit gave the highest value for the patient sub-group that produced a precipitin band (Ouchterlony gel diffusion assay).

Therefore it is suggested that the reaction of lymphocytes to tumor associated antigens is maintained to a considerable extent, although ADCC activity of the patient group was decreased. However, the antibody producing phenomenon toward the tumor associated antigen might be restrained.

Key words: Bladder carcinoma, Tumor extract, ADCC

はじめに

動物実験などにおいて癌組織・癌細胞には正常組織には存在しない抗原性が出現すると言われて久しいが、ヒトの場合には癌に特異的な抗原の検出は極めて困難である。ヒトにおける自然発生癌では癌由来の抗原性はあっても極めて弱いか、またはマスクされた状態にあるため検出が困難とされている。私どもはこれまで膀胱癌患者を対象として leukocyte adherence inhibition test (LAI) や leukocyte migration inhibition test (LMI) を試みて膀胱癌細胞由来と考えられる抗原性の存在を示唆した¹⁾。しかし、それぞれの反応性は極めて弱く、不安定であったため今回は膀胱癌患者尿中より抗原性物質の検出を試み、かつ患者血清中の抗体産生について anticody dependent cell-mediated cytotoxicity (以下 ADCC と略す) を応用して検討したところ興味ある結果が得られたので報告する。

対象および方法

1) 対象

対象とした症例は大阪市大病院に入院した膀胱癌患者 30 例で、男性 22 例、女性 8 例である。平均年齢は 63.4 歳で膀胱癌取扱い規約に基づく悪性度 (grade) および深達度 (stage) の分布を Table 1 に示す。組織学的所見ではすべてが移行上皮癌であった。なお対照群として age matched した良性疾患患者 26 例を選んだ。その内訳は Table 2 に示すとおり男性 20 例、女性 6 例で平均年齢は 60.5 歳であった。

2) 方法

a) 抗腫瘍家兔血清の作製 (Fig. 1)

使用した家兔はニュージーランドホワイトラビット (6 週齢、体重 2.5~2.7 kg、日本クレアより購入) で、まず手術にて摘出された膀胱癌組織より 3M-KCl 法 (McCoy らの方法²⁾) に準じて tumor extract を抽出し、Fig. 1 に示すとおりこの extract の一定量 (蛋白濃度) と Freund's complete adjuvant (和光純薬工業 K.K.) とを 1 週間隔で 3 回家兔に皮下注射する。その後 1 週間経て、追加免疫として 1.0 mg の Extract を静注し、以後 4 週間以上経過したのち耳静脈より採血し血清を分離、これをヒト赤血球および正常組織にて吸収した。得られた抗血清は 56℃、30 分間非働化したのち -80℃ にて使用時まで凍結保存した。

b) 患者尿中よりの腫瘍関連物質の抽出

膀胱癌患者より採集された尿 (1,000~1,500 ml) を Gozzo ら³⁾ の方法に準じて処理した。すなわち、ま

Table 1. 対象患者の悪性度および深達度分布

Grade	Stage	low		high	
		Ta ₁	T ₂	T ₃	T ₄
low	0	2	1	1	0
	I	2	8	1	0
high	II	1	4	6	1
	III	0	0	1	2

average age: 63.4 y.o.

Table 2. 対照群の疾患名

Diagnosis	Cases
Ureteral calculus	6
Renal calculus	6
Benign prostatic hypertrophy	4
Bladder neck contracture	3
Urethral stenosis	3
Hypertension	1
Renal bleeding	1
Hydrocele testis	1
Epididymitis	1
total	26

male 20, female 6, average age: 60.5 y.o.

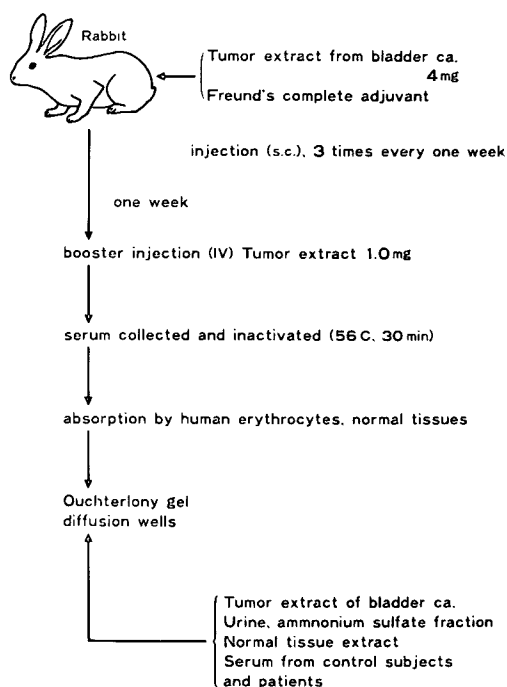


Fig. 1. 抗腫瘍家兔血清の作製法

ず 3,000 g にて 20 分間遠心したのち、その上清を 4℃ にて約 10 時間水中にて透析 (脱塩) する。次にこれより硫酸分画を抽出し、最後に 12 時間以上水中にて脱塩

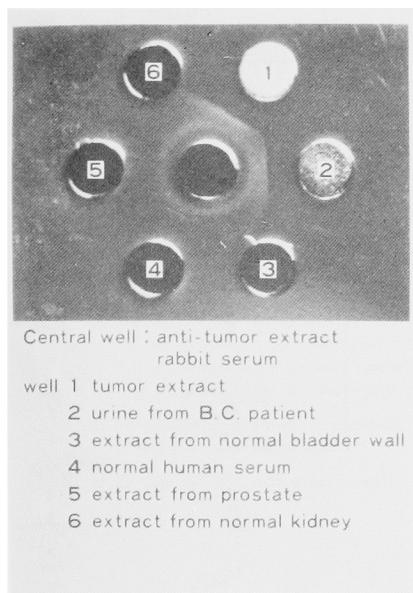


Fig. 2. Ouchterlony gel diffusion assay

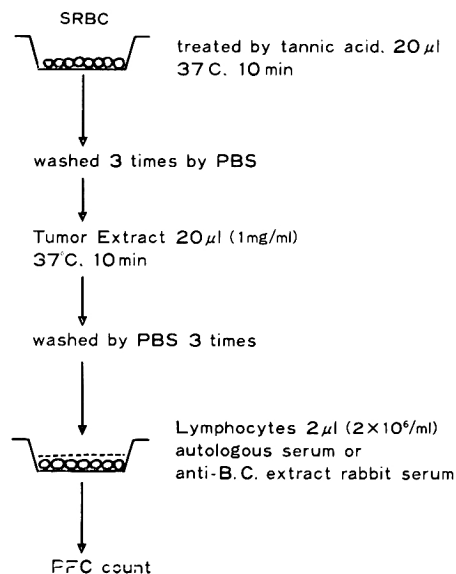


Fig. 3. Flow chart of specific ADCC assay by plaque formation

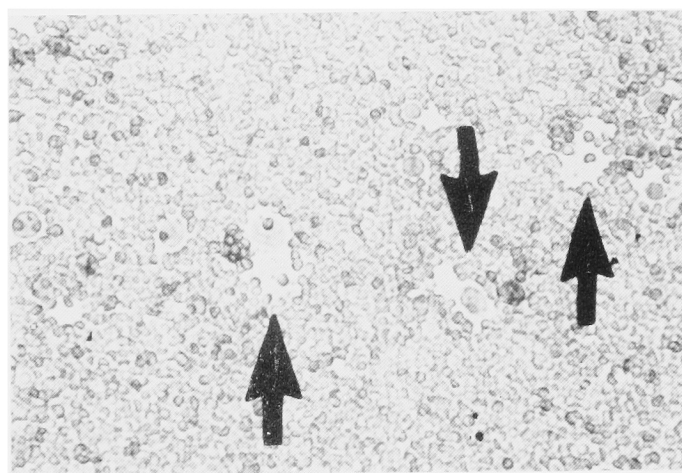


Fig. 4. Plaque forming cell (矢印) を示す

したのち Lowry 法⁴⁾で蛋白濃度を測定、使用時まで -80°C で保存した。各患者から得られた尿抽出物はその後 Ouchterlony gel diffusion assay を用いて先述の抗血清との間に沈降線が得られるか否かを検索した。Fig. 2 はその 1 例を示す、すなわち中心の well は先述の抗腫瘍家兎血清で、周囲 6 個の well にはそれぞれ異なった資料を分注し、 4°C にて 24 時間静置後、反応（沈降線の有無）を確認した。Fig. 2 の例では tumor extract と膀胱癌患者尿抽出物のみが反応を示している。

C) Specific ADCC assay の方法

ADCC assay の手技は既報にて報告しているので

詳細は割愛するが⁵⁾、操作プレートはキット化（日本抗体研究所 K.K.）されたものを用いた。今回は Fig. 3 に示すごとく標的細胞となる羊赤血球（SRBC）をまずタンニン酸で処理する（この操作で SRBC 膜上に蛋白成分が付着しやすくなる）。次にこれを 3 回洗浄したのち tumor extract を SRBC 上に添加し 37°C にて 10 分間静置したものを assay plate として用いた。すなわち、以上の操作を施された SRBC 層上に末梢血リンパ球、自己血清または抗腫瘍家兎血清を加え、 37°C で 3 時間培養し、染色を行ってのち plaque forming cell (PFC) 数を検鏡下にカウントする。この場合リンパ球 200 個以上について観察し、

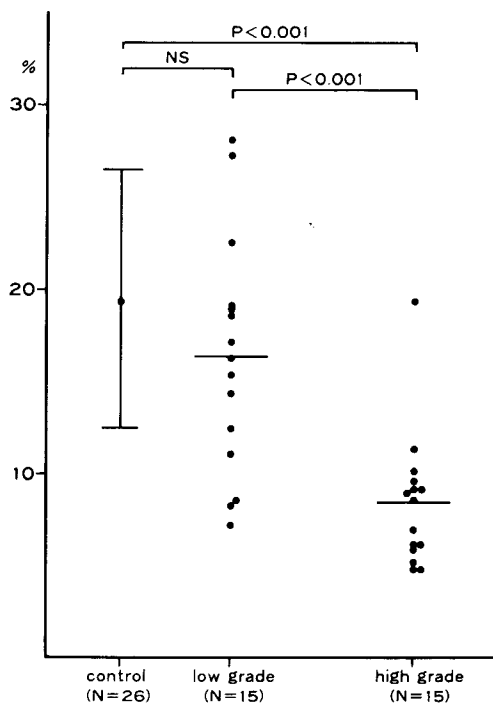


Fig. 5. 癌悪性度別の ADCC 活性の比較

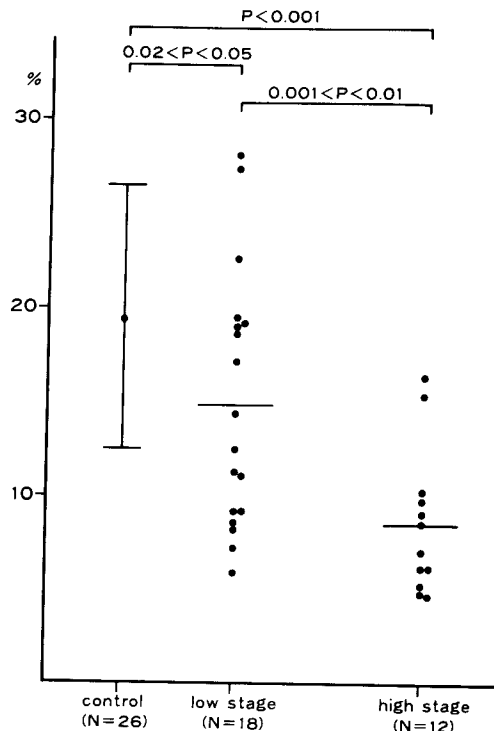


Fig. 6. 癌深達度別の ADCC 活性の比較

PFC (%) を算出, これをもって specific ADCC 活性とした. Fig. 4 は今回行った PFC の実例を示す (矢印).

結 果

1) 非特異的 ADCC 活性

腫瘍抽出物を用いた ADCC 活性を検討する前にまず, 従来より行われている非特異的な ADCC 活性を測定した. Fig. 5 は膀胱癌の悪性度 (grade) 別に low grade と high grade の 2 群に分けて比較したものである. 対象群と low grade 群の ADCC 活性の間には差を認めないが, low grade 群と high grade 群の間では明らかな差をもって high grade 群の方が低下していた. Fig. 6 は癌の深達度 (stage) 別に比較したもので, この場合は対照群, low stage 群, ついで high stage 群の順に ADCC 活性は低下する傾向が認められ, これら 3 者の間にはそれぞれ有意差が示された.

2) Specific ADCC 活性

Fig. 7, Table 3 は患者尿抽出物と抗腫瘍家兔血清とが反応を示さなかった (沈降線を作らなかった) 13 症例に関する specific ADCC 活性を示す. ここで ㊶群は tumor extract で処理しない SRBC plate

にリンパ球のみ作用させたもの, ㊷群は SRBC plate に tumor extract をコーティングし, これにリンパ球を反応させたもの, ㊸群は㊷群に自己血清を添加したもの, ㊹群は㊷群に抗腫瘍家兔血清を添加した場合を示す. ㊶群, ㊷群にはまったく抗体が存在しないためこの場合の plaque formation rate (%) は ADCC 活性とは考えられないが, 比較の意味で記載した. その結果は㊸群の自己血清を添加した場合に比して㊹群の抗腫瘍家兔血清を添加した場合の方が若干高い ADCC 活性を示したが, 有意差は認められなかった. つぎに Fig. 8, Table 3 は沈降線を認めた 10 症例の specific ADCC 活性を示す. この場合, ㊸群, すなわち自己血清のみ添加した群の ADCC 活性は 9.29 ± 2.36 で前述の沈降線を作らなかった場合の ADCC 活性 5.26 ± 1.38 より明らかに高い値を示している. しかし自己血清に加えて抗腫瘍家兔血清を添加した場合の ADCC 活性は 17.9 ± 2.34 と極めて高い値を示した. 一方, 膀胱癌以外の悪性疾患 (陰茎癌, 前立腺癌, 腎癌) にて入院中の患者末梢血よりそれぞれリンパ球を分離し, 今回の方法に準じて ADCC 活性を測定した (この場合の tumor extract もこれまでと同じ膀胱癌より得たものを使用した). その結果は Fig. 9 に示すとおり ㊶~㊹ 群いずれか

Table 3. Specific ADCC 活性の一覧表

(%、 $M \pm SD$)

	N	A	B	C	D
Control subjects	10	5.96 ± 1.56	6.24 ± 1.63	6.23 ± 1.07	5.78 ± 0.85
Bladder carcinoma					
precipitin band positive ^{a)}	10	4.45 ± 1.22	4.80 ± 2.85	$9.29 \pm 2.36^{c)}$	$17.90 \pm 2.34^{d)}$
precipitin band negative ^{b)}	13	4.30 ± 0.92	3.86 ± 0.98	5.26 ± 1.38	6.30 ± 2.34
Other malignant diseases	6	3.38 ± 0.58	3.57 ± 0.50	3.51 ± 0.61	3.65 ± 0.36

column A SRBC+Lymphocytes

B SRBC+Tu. Extract+Lymphocytes

C SRBC+Tu. Extract+autologous serum+Lymphocytes

D SRBC+Tu. Extract+anti-tumor extract rabbit serum

a), b) Ouchterlony gel diffusion assay, anti-tumor extract rabbit serum and urine from patients with bladder carcinoma

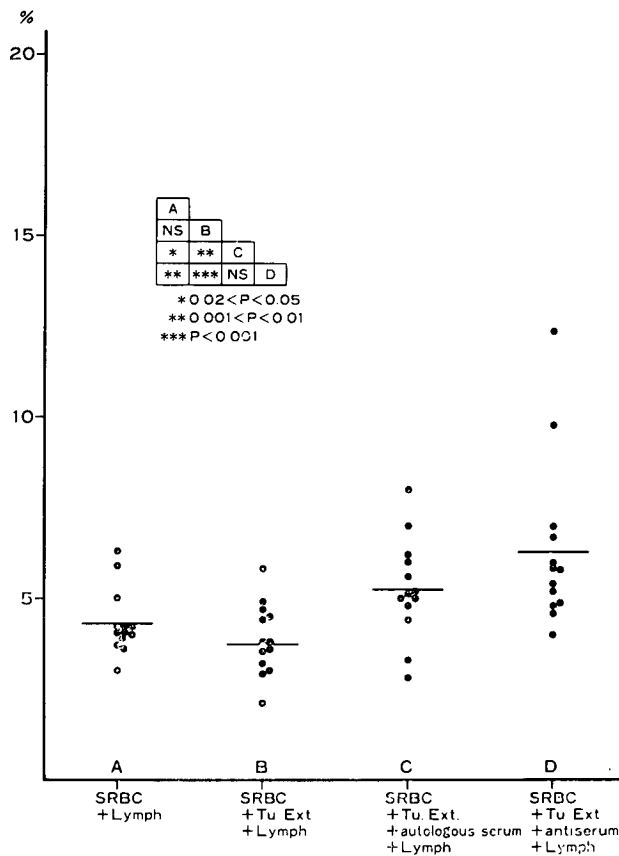
c), d) Significance was determined by Student's t-test c) $0.001 < P < 0.01$, d) $P < 0.001$ 

Fig. 7. 陰性群 (13例) における specific ADCC 活性

においても明らかな反応は認められなかった。

考 察

癌細胞は元来正常であった細胞が何らかの要因で変化したものであり、したがって癌細胞には、その細胞

の母体とも言える元の臓器に由来する組織特有の抗原性に加えて癌化したことにより新たに別の抗原性が発現すると考えられている。これまでの動物実験においてはいわゆる癌細胞由来の特異抗原の検出、存在に関して報告されている²⁻³⁾。一方、ヒト癌の場合も癌抗原

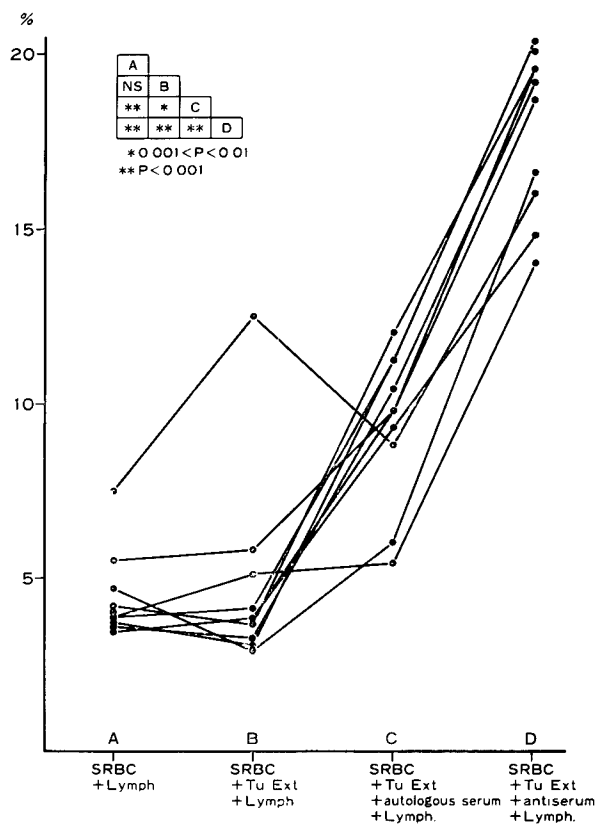


Fig. 8. 陽性群 (10例) における specific ADCC 活性

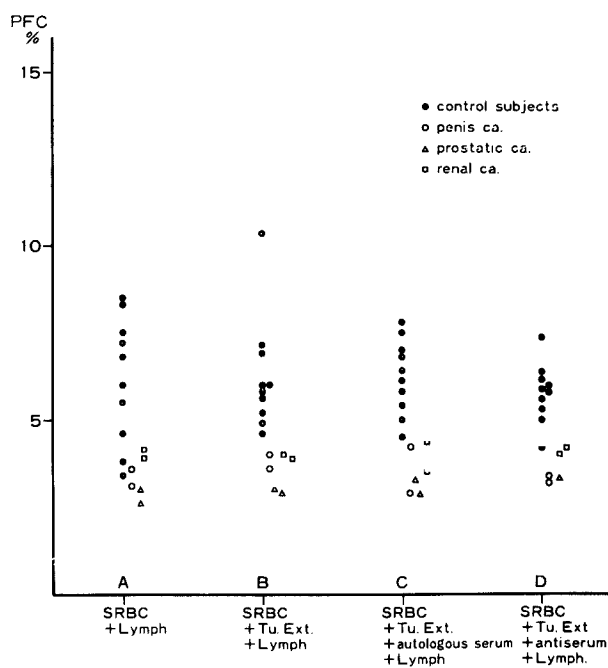


Fig. 9. 陰茎癌, 前立腺癌, 腎癌における ADCC 活性

の存在に関しては認められつつも、その検出証明は極めて困難である。すなわち動物実験におけるごとく *in vivo* の実験がヒトでは不可能なため、一般的には *in vitro* の手法を用いて行われている。私どもも膀胱癌に関して LAI テストや LMI テストを試みて癌組織抽出液中の抗原性物質の検出結果を報告してきた¹⁾。しかし、その検出率は低く非特異的反応が惹起される可能性もあるため今回はまず癌組織抽出物に対する抗血清を家兎を用いて作製し、これと癌組織抽出物との間における反応 (ouchterlony gel diffusion assay) を検討した。また同時に膀胱癌組織は常に尿中に浸っているため尿中における癌細胞由来物質の存在が考えられる。そこで Gozzo ら³⁾ の方法に準じて尿中癌関連物質の検出を前述の抗血清との反応を利用して試みた。その結果、検索し得た23例中10例 (43.5%) が陽性、13例 (56.5%) が陰性であった。そこで陰性群、陽性群について specific ADCC 活性の測定を試みた。まず陰性群の場合は自己血清を加えても、家兎抗血清を加えても著明な反応は認められなかった。しかし陽性群では自己血清を加えるとその反応性は約2倍に増巾され、さらに家兎抗血清を加えると約4倍に増強された。すなわち、癌抽出物と自己血清中の抗体あるいは家兎抗血清中の抗体とが反応しこの抗体の Fc 部分とリンパ球の Fc レセプターとが結合して ADCC 活性が増加されたものと考えられる。以上の結果より陰性群では自己血清を加えた場合でも明らかな ADCC 活性の増強が示されなかった点より、(1)陰性群の癌組織由来無質の抗原性が極めて低い可能性と、(2)逆に抗原性はあってもそれに対する宿主の反応が弱い、あるいは障害され、結果的に抗体産生能が低下している可能性とが推測される。一方、陽性群の場合には抗原性は認められるが、ADCC 活性において自己血清を加えた場合よりも家兎抗血清添加時の方がより強い活性を示していた。したがって陽性群も宿主の抗体産生能の低下あるいは抗体産生に対する障害、阻止因子の存在が示唆される。以上のように陰性群、陽性群いずれにおいても癌組織に対する抗体産生は極めて低いものと考えられ、従来より報告されている癌患者血清中の免疫反応阻害物質の存在が改めて重要視される^{9,10)}。したがって *in vitro* にて強い ADCC 活性が認められた場合でも *in vivo* においては必ずしもその結果と parallel な結果が得られるとは限らない。しかし今回用いた手法を応用すれば、例えば、家兎抗血清を標識して膀胱内注入することにより腫瘍部分が標識される可能性がある。また外来患者尿中の抗原性物質のスクリーニングテストとしても利

用され得るものと考えている。今後さらに症例を重ね、臨床応用の可能性についても検討していく予定である。

ま と め

1) 膀胱癌患者30例を対象に ADCC assay および specific ADCC assay を試みた。

2) ADCC assay は high grade 群、high stage 群で低下する傾向にあった。

3) Specific ADCC assay は抗腫瘍家兎血清と沈降線を描く陽性群では明らかな反応性が認められ、とくに家兎抗血清を加えた場合に強い ADCC 活性が認められた。したがって膀胱癌患者の抗腫瘍性抗体産生能は著しく低下しているか、あるいは抗体産生を抑制する因子の存在が示唆された。

文 献

- 1) 西尾正一・堀井明範・森川洋二・川喜多順二・西島高明・前川正信 膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究、第4報。日泌尿会誌 70: 305~316, 1979
- 2) McCoy JL, Jerome LF and Dean JH: Inhibition of leukocyte migration by tumor associated antigens in soluble extracts of human breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 53: 11~17, 1974
- 3) Gozzo JJ, Cronin WJ, O'Brien P and Monaco AP: Detection of tumor associated antigens in urine from patients with bladder carcinoma. J Urol 124: 804~807, 1980
- 4) Loery OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall R Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193 265~275, 1951
- 5) 西尾正一・池本慎一・尾崎祐吉・和田誠次・堀井明範・川喜多順二・前川正信: 膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究、第8報。泌尿紀要 28: 1387~1391, 1982
- 6) Foley EJ: Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumor in mice of the strain of origin. Cancer Res 13: 835~837, 1953
- 7) Prehn RT and Main JM: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. J Natl Cancer Inst 18: 769~778, 1957
- 8) Sjögren HO: Transplantation methods as a

tool for detection of tumor specific antigens.
 Progr Exp Tumor Res 6: 289~296, 1965

- 9) 西尾正一：膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究，第3報．日泌尿会誌 69：347~356，1978

- 10) 西尾正一・尾崎祐吉・和田誠次・川喜多順二・前川正信：膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究，第10報．泌尿紀要 30：449~457，1984

(1985年8月16日受付)

新世代

緑膿菌にまで抗菌スペクトルを広げた第三世代のセフェム系抗生物質製剤。台糖ファイザーから...

Cefobid®



レンサ球菌属*

肺炎球菌

大腸菌

変形菌

バクテロ

イテス属

緑膿菌

インフルエンザ菌

エンテロバクター属

シロバクテラ属

セリチア属

*腸球菌を除く

ADA-8302

セフェム系抗生物質製剤

セフォビッド®

注射用セフォペラゾンナトリウム(略号:CPZ)

- セフォビッドは、より広い抗菌スペクトルをもち、緑膿菌、セラチアを含むグラム陰性菌およびグラム陽性菌に優れた抗菌力を示す。
- 速やかに高い血中濃度が得られ、血中半減期も長いので、1日2回投与で、良好な臨床効果が期待できる。
- 腎と肝の2種類の排泄経路をもつため、腎機能低下患者でも過剰蓄積をきたし難い。

〔適応症〕

緑膿菌、プロテウス・ミラビリス、プロテウス・モルガニー、プロテウス・ブルガリス、プロテウス・レググー、クレブシエラ属、セラチア属、大腸菌、エンテロバクター属、シロバクテラ属、インフルエンザ菌、連鎖球菌属(腸球菌を除く)、肺炎球菌、バクテロイデス属のうち、本剤感受性菌による下記感染症
 敗血症、蜂窩織炎、乳腺炎、リンパ管炎、気管支炎、気管支拡張症の感染時、肺炎、慢性呼吸器疾患の二次感染、肺化膿症、膿胸、胆管炎、胆嚢炎、胆嚢炎、胆嚢炎、腎盂腎炎、膀胱炎、尿道炎、前立腺炎、子宮付属器管、バルトリン腺炎、子宮内感染、子宮旁結合織炎、髄膜炎

〔取り扱い上の注意〕

注意 一医師等の処方せん・指示により使用すること
 貯法 冷所保存(15℃以下)
 有効期間 検定合格の翌月から2年。最終有効年月は外面に記載。

規制区分 筋注用添付溶解液一剤薬

*使用上の注意、用法・用量は製品添付文書をご参照ください。

Pfizer

科学を世界の向上のために

台糖ファイザー株式会社
 東京都新宿区西新宿2-1-1 TEL(344)4411 千60